

ICP-MS法同时测定小牛血去蛋白提取物注射液中14种元素的含量^Δ

邵天舒*, 周长明, 余立, 郭雷[#](北京市药品检验所中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京102206)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1902-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.07

摘要 目的:建立同时测定小牛血去蛋白提取物注射液中14种元素含量的方法。方法:采用电感耦合等离子体质谱法。射频功率为1 350 W,载气(氩气)流量为1.1 L/min,碰撞气(氦气)流量为4.5 L/min,积分时间为1.5 s,等离子体气流量为18 L/min,采样深度为65 mm,进样蠕动泵转速为24.0 r/min,数据采集模式为跳峰模式,重复次数为3次。结果:镉、铅、砷、汞、钴、钒、镍、铈、银、钼、铜、铬、钡、铝的检测质量浓度线性范围分别为0.05~50 μg/L($r=0.9997$)、0.05~50 μg/L($r=0.9997$)、0.05~50 μg/L($r=0.9998$)、0.05~50 μg/L($r=0.9995$)、0.05~50 μg/L($r=0.9995$)、0.05~50 μg/L($r=0.9998$)、0.05~50 μg/L($r=0.9996$)、0.05~50 μg/L($r=0.9995$)、0.05~50 μg/L($r=0.9995$)、0.05~50 μg/L($r=0.9998$)、0.05~50 μg/L($r=0.9996$)、0.05~50 μg/L($r=0.9996$)、0.05~50 μg/L($r=0.9997$)、0.5~70 μg/L($r=0.9998$);定量限分别为0.003 1、0.008 9、0.016 0、0.025 0、0.002 1、0.006 9、0.038 1、0.002 1、0.005 5、0.002 0、0.023 1、0.005 0、0.002 0、0.324 9 μg/L;检测限分别为0.000 9、0.002 7、0.004 8、0.007 5、0.000 6、0.002 1、0.011 4、0.000 6、0.016 5、0.000 6、0.006 9、0.001 5、0.000 6、0.097 5 μg/L;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于8%;加样回收率分别为87.4%~94.3% (RSD=2.6%, $n=9$)、110.3%~118.2% (RSD=1.8%, $n=9$)、89.8%~99.7% (RSD=3.1%, $n=9$)、77.7%~84.4% (RSD=2.5%, $n=9$)、105.6%~113.4% (RSD=2.3%, $n=9$)、106.7%~116.5% (RSD=2.7%, $n=9$)、89.1%~104.5% (RSD=4.5%, $n=9$)、105.6%~118.6% (RSD=3.6%, $n=9$)、77.8%~88.0% (RSD=4.0%, $n=9$)、106.7%~116.1% (RSD=2.8%, $n=9$)、88.5%~97.1% (RSD=3.1%, $n=9$)、80.5%~88.6% (RSD=2.9%, $n=9$)、85.2%~99.4% (RSD=4.2%, $n=9$)、97.6%~109.3% (RSD=3.2%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、准确,精密性、稳定性、重复性均较好,可用于同时测定小牛血去蛋白提取物注射液中14种元素的含量。

关键词 小牛血去蛋白提取物注射液;元素;电感耦合等离子体质谱法;含量测定

Simultaneous Determination of 14 Elements in Deproteinized Calf Blood Extractives Injection by ICP-MS

SHAO Tianshu, ZHOU Changming, YU Li, GUO Lei (Beijing Key Lab of TCM Component Analysis and Biological Evaluation, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of 14 elements in Deproteinized calf blood extractives injection. METHODS: Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) was adopted. The radiofrequency power was 1 350 W; flow rate of carrier gas (argon) and collision gas (helium) was 1.1 L/min and 4.5 L/min respectively; integration time was 1.5 s; plasma gas flow rate was 18 L/min; depth of sampling was 65 mm; speed of sampling peristaltic pump was 24.0 r/min; data sampling mode was peak-jump acquisition mode; data collection was repeated for 3 times. RESULTS: The linear ranges of Cd, Pb, As, Co, V, Ni, Tl, Ag, Mo, Cu, Cr, Ba and Al were 0.05-50 μg/L ($r=0.9997$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9997$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9998$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9995$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9995$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9998$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9996$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9995$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9995$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9998$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9996$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9996$), 0.05-50 μg/L ($r=0.9997$) and 0.5-70 μg/L ($r=0.9998$), respectively. The limits of quantitation were 0.003 1, 0.008 9, 0.016 0, 0.025 0, 0.002 1, 0.006 9, 0.038 1, 0.002 1, 0.005 5, 0.002 0, 0.023 1, 0.005 0, 0.002 0, 0.324 9 μg/L, separately. The limits of determination were 0.000 9, 0.002 7, 0.004 8, 0.007 5, 0.000 6, 0.002 1, 0.011 4, 0.000 6, 0.016 5, 0.000 6, 0.006 9, 0.001 5, 0.000 6, 0.097 5 μg/L, separately. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 8%. The recoveries were 87.4%-94.3% (RSD=2.6%, $n=9$), 110.3%-118.2% (RSD=1.8%, $n=9$), 89.8%-99.7% (RSD=3.1%, $n=9$), 77.7%-84.4% (RSD=2.5%, $n=9$), 105.6%-113.4% (RSD=2.3%, $n=9$), 106.7%-116.5% (RSD=2.7%, $n=9$), 89.1%-104.5% (RSD=4.5%, $n=9$), 105.6%-118.6% (RSD=3.6%, $n=9$), 77.8%-88.0% (RSD=4.0%, $n=9$), 106.7%-116.1% (RSD=2.8%, $n=9$), 88.5%-97.1% (RSD=3.1%, $n=9$), 80.5%-88.6% (RSD=2.9%, $n=9$), 85.2%-99.4% (RSD=4.2%, $n=9$), 97.6%-109.3% (RSD=3.2%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate. The precision, stability and repeatability of this method are also good. It is suitable for simultaneous determination of 14 elements in Deproteinized calf blood

^Δ 基金项目:国家科技重大专项子课题(No.2017zx09101001-007)

* 主管药师,硕士。研究方向:生化药物与生物制品质量控制。电话:010-52779655。E-mail:shaotians@sina.com

[#] 通信作者:主管药师,硕士。研究方向:生化药物与生物制品质量控制。电话:010-52779655。E-mail:leileimap@sina.com

extractives injection.

KEYWORDS Deproteinized calf blood extractives injection; Element; Inductively coupled plasma-mass spectrometry; Content determination

因来源和组分的复杂性,由动物组织器官提取制备的多组分生化药已成为备受学者关注的焦点和相关药品质量控制研究的热点^[1]。小牛血去蛋白提取物是将新生小牛静脉血去除蛋白质后,经透析、浓缩、超滤等工艺制成的含有小分子多肽、氨基酸及无机元素等的混合物,该药主要用于脑缺血、痴呆、脑外伤及大脑功能不全等脑细胞代谢障碍性疾病的治疗^[2]。目前,有关该药质量控制方面的研究主要为其活性组分如多肽、氨基酸以及钠钾离子的含量检测^[3-4],而对于其中元素控制方面尚无文献报道,且现行国家药品标准 WS1-XG-029-2000 和进口药品注册标准 JX20030248 中也未见对该药中元素控制的相关项目^[5-6]。

近年来,随着环境污染日益严重,动物在养殖过程中的饮用水、饲料受到有害元素如汞(Hg)、铅(Pb)、砷(As)、镉(Cd)、铝(Al)等污染的概率也随之增加,且金属元素易与动物体内的多肽、蛋白质等成分整合,使得金属元素在动物组织器官来源的药物中形成残留^[7]。过量的 Hg 可危害人体中枢神经系统,As 则会影响细胞代谢,Pb 对神经系统、消化系统和造血系统都有毒性作用,Cd 中毒可能会导致肾功能损伤及骨骼软化^[8],Al 在体内的蓄积可能具有引发软骨病、低血色素性贫血、老年性痴呆和慢性肾功能损伤等潜在风险^[9]。现行 2015 年版《中国药典》(四部)通则“0102”对中药注射剂中部分元素按每日最大使用量进行逐一限量规定^[10]。因此,对小牛血去蛋白提取物注射液中元素进行监测对保障用药安全具有重要意义。

电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)具有灵敏、准确、快速的优点,已成为同时测定多种痕量元素含量的首选方法^[11-12]。本研究采用 ICP-MS 法同时测定了国内外 3 家企业 24 批小牛血去蛋白提取物注射液中 Cd、Pb、As、Hg、钴(Co)、钒(V)、镍(Ni)、铊(Tl)、银(Ag)、钼(Mo)、铜(Cu)、铬(Cr)、钡(Ba)、Al 等 14 种元素的含量,旨在为深入研究该药中各元素的分布及来源、临床用药的安全性评估及质量标准的提升提供依据,为类似的多组分生化药中多种元素的控制提供参考,为注射剂仿制药一致性评价中的元素控制提供支持。

1 材料

1.1 仪器

NexION 300X 型 ICP-MS 仪,包括雾化器、四级杆、检测器(美国 Perkin Elmer 公司);WD-A 型药物稳定性检查仪(天津药典标准仪器厂);XS205 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);Milli-Q 型超纯水机(美国

Millipore 公司,电阻率:18.2 MΩ·cm)。

1.2 药品与试剂

小牛血去蛋白提取物注射液(进口 A 企业,批号:00911015、00921015、00931015、00941015、00951015、00961015、00971015、00991115、10923971、10924161、10924163、10946880、10946882、10958367、10960009,规格:10 mL:400 mg,编号:S1~S15;国产 B 企业,批号:181013-2、181014-2、181015-2、1705003-2、1705004-2、1705005-1,规格:10 mL:400 mg,编号:S16~S21;国产 C 企业,批号:10618023-2,规格:5 mL:200 mg;批号:10718065-3、10718079-2,规格:10 mL:400 mg;编号:S22~S24);Hg 标准品溶液(中国计量科学研究院,批号:GBW08617/18031,质量浓度:1 000 μg/mL);Cd、Pb、As、Co、V、Ni、Tl、Ag、Mo、Cu、Cr、Ba、Al 混合标准溶液(批号:3-122MKBY2,质量浓度均为 10 μg/mL)以及铋(Bi)、锗(Ge)、铟(In)、铷(Rb)、铈(Ce)混合内标贮备液(批号:3-62MKBY2,质量浓度均为 100 μg/mL)均购自美国 Agilent 公司;金(Au)标准品溶液(美国 Inorganic Ventures 公司,批号:K2-AU04064,质量浓度:1 000 μg/mL);硝酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 ICP-MS 条件

射频功率:1 350 W;载气(氩气)流量:1.1 L/min;碰撞气(氦气)流量:4.5 L/min;积分时间:1.5 s;等离子体气流量:18 L/min;采样深度:65 mm;进样蠕动泵转速:24.0 r/min;数据采样模式:跳峰模式;重复次数:3 次。各元素分析参数见表 1。

表 1 各元素分析参数

Tab 1 Analytical parameters of each element

待测元素	m/z	分析模式	内标元素
Cd	112	标准模式	In
Pb	208	标准模式	Bi
As	75	动能歧视模式	Ge
Hg	202	标准模式	In
Co	59	标准模式	Ge
V	51	动能歧视模式	Ge
Ni	60	标准模式	Ge
Tl	205	标准模式	Bi
Ag	107	标准模式	Rh
Mo	96	标准模式	In
Cu	65	标准模式	Ge
Cr	52	动能歧视模式	Ge
Ba	138	标准模式	Lu
Al	27	标准模式	Sc

2.2 溶液的制备

2.2.1 内标溶液 精密量取混合内标贮备液 1 mL,置于 100 mL 聚四氟乙烯量瓶中,加 1% 硝酸溶液定容至刻度,摇匀,即得各内标元素质量浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标溶液。

2.2.2 混合标准品溶液 精密量取混合标准溶液 0.5 mL,置于 10 mL 聚四氟乙烯量瓶中,加 1% 硝酸溶液定容至刻度,摇匀,即得各元素质量浓度均为 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准品贮备液。精密量取 Hg 标准品溶液 1 mL,置于 20 mL 聚四氟乙烯量瓶中,加 1% 硝酸溶液定容至刻度,摇匀,取 1 mL,置于 100 mL 聚四氟乙烯量瓶中,加 1% 硝酸溶液定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 Hg 标准品贮备液。分别精密量取上述混合标准品贮备液及 Hg 标准品贮备液 0.01、0.1、0.2、1、4、10、14 mL,置于 100 mL 聚四氟乙烯量瓶中,加入“2.2.1”项下内标溶液及 Au 稳定剂溶液(取 Au 标准品溶液适量,加 1% 硝酸溶液定容至刻度,制得质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Au 稳定剂溶液)各 1 mL,加 1% 硝酸溶液定容至刻度,摇匀,即得各元素质量浓度分别均为 0.05、0.5、1、5、20、50、70 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列混合标准品溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密量取样品 2 mL,置于 100 mL 聚四氟乙烯量瓶中,加入“2.2.1”项下内标溶液和“2.2.2”项下 Au 稳定剂溶液各 1 mL,加 1% 硝酸溶液定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 空白溶液 以 1% 硝酸溶液为空白溶液。

2.3 线性关系考察

取“2.2.2”项下系列混合标准品溶液各适量,按“2.1”项下 ICP-MS 条件连续进样,记录仪器响应值。以各待测元素质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{L}$)为横坐标、各待测元素与内标的响应值比值(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表 2。

表 2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测元素	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g}/\text{L}$
Cd	$y=3.801 \times 10^{-3}x+5.658 \times 10^{-4}$	0.999 7	0.05~50
Pb	$y=6.609 \times 10^{-3}x+1.157 \times 10^{-3}$	0.999 7	0.05~50
As	$y=4.223 \times 10^{-3}x+7.904 \times 10^{-5}$	0.999 8	0.05~50
Hg	$y=1.648 \times 10^{-3}x+4.557 \times 10^{-4}$	0.999 5	0.05~50
Co	$y=6.337 \times 10^{-3}x+1.381 \times 10^{-3}$	0.999 5	0.05~50
V	$y=3.326 \times 10^{-3}x-1.369 \times 10^{-3}$	0.999 8	0.05~50
Ni	$y=1.709 \times 10^{-3}x-1.023 \times 10^{-3}$	0.999 6	0.05~50
Tl	$y=8.906 \times 10^{-3}x+1.184 \times 10^{-2}$	0.999 5	0.05~50
Ag	$y=4.151 \times 10^{-3}x-1.355 \times 10^{-3}$	0.999 5	0.05~50
Mo	$y=2.566 \times 10^{-3}x-1.751 \times 10^{-4}$	0.999 8	0.05~50
Cu	$y=7.219 \times 10^{-3}x+1.940 \times 10^{-3}$	0.999 6	0.05~50
Cr	$y=2.817 \times 10^{-3}x-2.844 \times 10^{-3}$	0.999 6	0.05~50
Ba	$y=5.710 \times 10^{-3}x+5.213 \times 10^{-4}$	0.999 7	0.05~50
Al	$y=7.279 \times 10^{-3}x-1.396 \times 10^{-3}$	0.999 8	0.50~70

2.4 定量限与检测限考察

取“2.2”项下空白溶液和系列混合标准品溶液各适

量,按“2.1”项下 ICP-MS 条件连续进样测定 10 次,记录仪器响应值并计算标准偏差。以标准偏差与标准曲线斜率之比的 10 倍对应的元素质量浓度作为定量限,以标准偏差与标准曲线斜率之比的 3 倍对应的元素质量浓度作为检测限,结果见表 3。

表 3 定量限与检测限结果

Tab 3 Quantitation limits and detection limits

待测元素	定量限, $\mu\text{g}/\text{L}$	检测限, $\mu\text{g}/\text{L}$	待测元素	定量限, $\mu\text{g}/\text{L}$	检测限, $\mu\text{g}/\text{L}$
Cd	0.003 1	0.000 9	Tl	0.002 1	0.000 6
Pb	0.008 9	0.002 7	Ag	0.005 5	0.016 5
As	0.016 0	0.004 8	Mo	0.002 0	0.000 6
Hg	0.025 0	0.007 5	Cu	0.023 1	0.006 9
Co	0.002 1	0.000 6	Cr	0.005 0	0.001 5
V	0.006 9	0.002 1	Ba	0.002 0	0.000 6
Ni	0.038 1	0.011 4	Al	0.324 9	0.097 5

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.2”项下混合标准品溶液(质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{L}$)适量,按“2.1”项下 ICP-MS 条件连续进样测定 6 次,记录仪器响应值。结果, Cd、Pb、As、Hg、Co、V、Ni、Tl、Ag、Mo、Cu、Cr、Ba、Al 仪器响应值的 RSD 分别为 3.6%、4.2%、1.5%、3.7%、3.7%、2.2%、0.4%、1.6%、3.4%、0.9%、2.7%、2.1%、1.5%、0.8% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密量取“2.2.3”项下供试品溶液(编号:S24)适量,分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10 h 时按“2.1”项下 ICP-MS 条件进样测定,记录仪器响应值。结果, Cd、Pb、As、Hg、Co、V、Ni、Tl、Ag、Mo、Cu、Cr、Ba、Al 仪器响应值的 RSD 分别为 3.2%、4.0%、1.9%、7.8%、2.2%、3.0%、2.1%、1.9%、4.2%、2.0%、3.4%、2.5%、3.6%、3.8% ($n=6$),表明供试品溶液于室温放置 10 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密量取样品(编号:S24)1 mL,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,再按“2.1”项下 ICP-MS 条件进样测定,记录仪器响应值并按内标法计算样品中 14 种元素的含量。结果, Cd、Pb、As、Hg、Co、V、Ni、Tl、Ag、Mo、Cu、Cr、Ba、Al 的平均含量分别为 0.201 5、0.091 3、0.100 4、0.077 6、0.039 4、0.094 6、0.998 9、0.115 1、0.280 6、0.412 6、0.034 9、1.625 3、5.999 4、14.146 6 $\mu\text{g}/\text{L}$,仪器响应值的 RSD 分别为 4.4%、6.4%、2.8%、5.4%、4.8%、3.8%、1.6%、3.9%、4.0%、1.0%、2.6%、2.2%、2.8%、1.5% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(编号:S24)2 mL,共 9 份,分别置于 100 mL 聚四氟乙烯量瓶中,加入低、中、高质量浓度的混合标准品溶液,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下 ICP-MS 条件进样测定,记录仪器响应值并计算加样回收率,结果见表 4。

表4 加样回收率试验结果(n=9)

待测元素	样品含量, $\mu\text{g/L}$	加入量, $\mu\text{g/L}$	测得量, $\mu\text{g/L}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
Cd	0.201 5	0.25	0.421 5	88.0	90.4	2.6
	0.201 5	0.25	0.431 8	92.1		
	0.201 5	0.25	0.424 5	89.2		
	0.201 5	0.5	0.673 0	94.3		
	0.201 5	0.5	0.662 5	92.2		
	0.201 5	0.5	0.666 5	93.0		
	0.201 5	0.75	0.857 0	87.4		
	0.201 5	0.75	0.872 0	89.4		
	0.201 5	0.75	0.863 0	88.2		
	0.201 5	0.75	0.863 0	88.2		
Pb	0.091 3	0.05	0.149 4	116.2	114.3	1.8
	0.091 3	0.05	0.148 6	114.6		
	0.091 3	0.05	0.148 7	114.8		
	0.091 3	0.1	0.201 6	110.3		
	0.091 3	0.1	0.203 9	112.6		
	0.091 3	0.1	0.205 1	113.8		
	0.091 3	0.15	0.268 6	118.2		
	0.091 3	0.15	0.262 9	114.4		
	0.091 3	0.15	0.261 7	113.6		
	0.091 3	0.15	0.261 7	113.6		
As	0.100 4	0.1	0.193 9	93.5	94.3	3.1
	0.100 4	0.1	0.193 0	92.6		
	0.100 4	0.1	0.190 2	89.8		
	0.100 4	0.2	0.299 8	99.7		
	0.100 4	0.2	0.283 4	91.5		
	0.100 4	0.2	0.287 2	93.4		
	0.100 4	0.3	0.384 8	94.8		
	0.100 4	0.3	0.387 5	95.7		
	0.100 4	0.3	0.394 7	98.1		
	0.100 4	0.3	0.394 7	98.1		
Hg	0.077 7	0.05	0.118 4	81.3	80.7	2.5
	0.077 7	0.05	0.119 2	83.0		
	0.077 7	0.05	0.117 3	79.2		
	0.077 7	0.1	0.158 5	80.8		
	0.077 7	0.1	0.155 9	78.2		
	0.077 7	0.1	0.162 1	84.4		
	0.077 7	0.15	0.200 0	81.5		
	0.077 7	0.15	0.194 3	77.7		
	0.077 7	0.15	0.197 7	80.0		
	0.077 7	0.15	0.197 7	80.0		
Co	0.039 4	0.05	0.094 6	110.3	109.0	2.3
	0.039 4	0.05	0.093 4	107.9		
	0.039 4	0.05	0.093 5	108.1		
	0.039 4	0.1	0.145 6	106.2		
	0.039 4	0.1	0.151 2	111.8		
	0.039 4	0.1	0.149 6	110.2		
	0.039 4	0.15	0.209 5	113.4		
	0.039 4	0.15	0.197 8	105.6		
	0.039 4	0.15	0.200 5	107.4		
	0.039 4	0.15	0.200 5	107.4		
V	0.094 6	0.1	0.207 2	112.6	110.0	2.7
	0.094 6	0.1	0.202 2	107.6		
	0.094 6	0.1	0.205 1	110.5		
	0.094 6	0.2	0.312 2	108.8		
	0.094 6	0.2	0.327 6	116.5		
	0.094 6	0.2	0.308 0	106.7		
	0.094 6	0.3	0.425 2	110.2		
	0.094 6	0.3	0.426 4	110.6		
	0.094 6	0.3	0.415 3	106.9		
	0.094 6	0.3	0.415 3	106.9		
Ni	0.998 9	0.5	1.444 4	89.1	98.0	4.5
	0.998 9	0.5	1.465 8	93.4		
	0.998 9	0.5	1.492 9	98.8		
	0.998 9	1	2.043 7	104.5		
	0.998 9	1	2.043 7	104.5		

续表4

待测元素	样品含量, $\mu\text{g/L}$	加入量, $\mu\text{g/L}$	测得量, $\mu\text{g/L}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
Ni	0.998 9	1	1.990 9	99.2	90.4	2.6			
	0.998 9	1	1.976 9	97.8					
	0.998 9	1.5	2.477 6	98.6					
	0.998 9	1.5	2.455 4	97.1					
	0.998 9	1.5	2.546 9	103.2					
	Tl	0.115 1	0.05	0.171 8			113.3	111.3	3.6
		0.115 1	0.05	0.167 9			105.6		
		0.115 1	0.05	0.169 2			108.2		
		0.115 1	0.1	0.226 6			111.5		
		0.115 1	0.1	0.233 7			118.6		
0.115 1		0.1	0.228 5	113.4					
0.115 1		0.15	0.278 6	109.0					
0.115 1		0.15	0.287 9	115.2					
0.115 1		0.15	0.275 0	106.6					
0.115 1		0.15	0.275 0	106.6					
Ag	0.280 6	0.25	0.485 9	82.1	83.0	4.0			
	0.280 6	0.25	0.500 6	88.0					
	0.280 6	0.25	0.478 9	79.3					
	0.280 6	0.5	0.717 6	87.4					
	0.280 6	0.5	0.708 1	85.5					
	0.280 6	0.5	0.701 1	84.1					
	0.280 6	0.75	0.885 0	80.6					
	0.280 6	0.75	0.864 1	77.8					
	0.280 6	0.75	0.896 4	82.1					
	0.280 6	0.75	0.896 4	82.1					
Mo	0.412 6	0.25	0.688 1	110.2	110.5	2.8			
	0.412 6	0.25	0.679 4	106.7					
	0.412 6	0.25	0.684 1	108.6					
	0.412 6	0.5	0.989 6	115.4					
	0.412 6	0.5	0.963 5	110.2					
	0.412 6	0.5	0.968 1	111.1					
	0.412 6	0.75	1.283 4	116.1					
	0.412 6	0.75	1.221 9	107.9					
	0.412 6	0.75	1.226 4	108.5					
	0.412 6	0.75	1.226 4	108.5					
Cu	0.034 9	0.05	0.081 3	92.8	91.8	3.1			
	0.034 9	0.05	0.083 5	97.1					
	0.034 9	0.05	0.082 6	95.4					
	0.034 9	0.1	0.125 1	90.2					
	0.034 9	0.1	0.123 4	88.5					
	0.034 9	0.1	0.124 2	89.3					
	0.034 9	0.15	0.169 3	89.6					
	0.034 9	0.15	0.174 7	93.2					
	0.034 9	0.15	0.170 1	90.1					
	0.034 9	0.15	0.170 1	90.1					
Cr	1.625 3	0.5	2.045 8	84.1	83.4	2.9			
	1.625 3	0.5	2.027 7	80.5					
	1.625 3	0.5	2.068 3	88.6					
	1.625 3	1	2.445 5	82.0					
	1.625 3	1	2.460 3	83.5					
	1.625 3	1	2.458 3	83.3					
	1.625 3	1.5	2.835 8	80.7					
	1.625 3	1.5	2.907 9	85.5					
	1.625 3	1.5	2.856 8	82.1					
	1.625 3	1.5	2.856 8	82.1					
Ba	5.999 4	5	10.509 5	90.2	90.0	4.2			
	5.999 4	5	10.969 4	99.4					
	5.999 4	5	10.374 6	87.5					
	5.999 4	10	15.099 7	91.0					
	5.999 4	10	14.829 3	88.3					
	5.999 4	10	14.519 4	85.2					
	5.999 4	15	19.454 4	89.7					
	5.999 4	15	19.634 8	90.9					
	5.999 4	15	19.634 8	90.9					
	5.999 4	15	19.634 8	90.9					

续表 4

Continued tab 4

待测元素	样品含量, $\mu\text{g/L}$	加入量, $\mu\text{g/L}$	测得量, $\mu\text{g/L}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
Ba	5.999 4	15	19.139 2	87.6		
Al	14.146 6	7.5	21.976 6	104.4	102.6	3.2
	14.146 6	7.5	21.804 1	102.1		
	14.146 6	7.5	22.344 1	109.3		
	14.146 6	15	29.116 7	99.8		
	14.146 6	15	29.641 6	103.3		
	14.146 6	15	29.926 2	105.2		
	14.146 6	25	38.547 6	97.6		
	14.146 6	25	39.221 5	100.3		
	14.146 6	25	39.421 6	101.1		

2.9 样品含量测定

取 24 批样品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶

液,再按“2.1”项下 ICP-MS 条件进样测定,记录仪器响应值并按内标法计算样品中各元素的含量,结果见表 5 (表中,“-”表示未检出,下同)。

2.10 每日最大暴露量(PDE)分析

国际人用药品注册技术协调会(ICH)发布的指导原则“Q3D”中将药品所含的元素(除 Al 外)按其风险由高到低分为 1 类(包括 Cd、Pb、As、Hg)、2A 类(包括 Co、V、Ni、Ti)、2B 类(Ag)及 3 类(包括 Mo、Cu、Cr、Ba),并对各元素按口服、注射、吸入等 3 种不同剂型分别规定了 PDE^[13]。按照该指导原则,根据公式: $\text{PDE} = \text{样品中各元素的质量浓度} \times \text{日服用剂量}$,将表 5 中(除 Al 外)各元素的含量结果进行换算,结果见表 6。

表 5 样品含量测定结果($n=3, \mu\text{g/L}$)Tab 5 Results of content determination of samples($n=3, \mu\text{g/L}$)

企业	编号	Cd	Pb	As	Hg	Co	V	Ni	Ti	Ag	Mo	Cu	Cr	Ba	Al
A	S1	-	-	27.505	-	-	4.730	8.655	-	-	33.520	2.508	3.640	1.550	395.210
	S2	-	-	24.513	-	-	5.505	15.245	-	-	35.010	3.655	3.520	2.270	389.060
	S3	-	-	27.565	-	-	4.038	3.125	-	-	32.340	2.200	6.915	2.588	295.405
	S4	-	-	24.870	-	-	5.695	3.315	-	-	34.010	1.920	2.893	6.655	329.335
	S5	-	-	30.080	-	-	4.765	16.010	-	-	35.963	5.310	3.825	7.120	338.805
	S6	-	-	24.065	-	-	6.170	7.590	-	-	31.790	2.595	3.498	7.530	484.255
	S7	-	-	29.120	-	-	5.010	4.005	-	-	32.505	2.065	3.218	5.625	275.800
	S8	-	-	27.480	-	-	5.575	12.520	-	-	31.280	3.588	3.263	3.560	428.425
	S9	-	-	25.790	-	-	6.263	4.310	-	-	32.595	2.265	3.690	7.500	358.670
	S10	-	-	28.063	-	-	6.505	14.990	-	-	32.270	3.063	3.755	5.900	442.250
	S11	-	-	28.575	-	-	6.810	12.513	-	-	30.250	2.575	2.970	6.295	447.610
	S12	-	-	34.150	-	-	6.525	7.340	-	3.200	35.038	2.245	3.150	4.835	543.945
	S13	-	-	30.805	-	-	7.065	11.040	-	8.885	34.455	1.625	6.380	5.500	481.925
	S14	-	-	34.015	-	-	6.003	4.620	-	5.055	34.040	3.055	5.670	3.745	585.005
	S15	-	-	32.445	-	-	8.700	5.395	-	7.590	34.000	-	4.005	3.640	562.875
B	S16	-	1.380	3.580	1.275	3.400	4.670	40.230	2.030	5.470	7.320	1.630	37.768	133.050	62.925
	S17	-	-	3.195	1.355	3.110	5.038	51.000	1.265	2.725	7.200	2.570	49.820	115.805	46.335
	S18	-	-	2.588	1.595	3.715	6.005	48.340	-	1.810	5.810	3.335	52.113	108.270	38.510
	S19	-	-	2.505	1.400	-	4.725	27.505	-	-	6.800	5.145	35.070	101.680	90.170
	S20	-	-	2.155	1.460	-	4.570	25.955	-	-	6.363	3.818	27.575	112.775	98.280
	S21	-	-	-	1.580	-	3.730	22.820	-	-	6.695	5.288	24.705	109.090	57.090
C	S22	10.305	5.260	6.100	3.505	1.890	4.395	47.753	4.515	7.810	21.485	2.005	75.750	478.825	771.170
	S23	16.800	8.105	11.345	3.723	1.850	5.505	49.020	7.190	38.013	19.205	2.575	81.120	442.255	833.605
	S24	10.075	4.565	5.020	3.883	1.970	4.730	49.945	5.755	14.030	20.630	1.745	81.265	299.970	707.330

由表 6 可知,24 批样品中 13 种元素均未超过 ICH 的限量值^[13]。国产 C 企业的 3 批样品中 Cd 含量分别达到限量值的 25%、40%、25%,Pb、As、Hg 均未超过 ICH 限量值的 15%,其他元素均未超过 ICH 限量值的 20%。提示该药含有的元素含量水平虽然存在差异,但均低于 ICH 限量值,因此该药用于临床是安全的。

2.11 Al 含量分析

将 24 批样品(与已测定的样品同批号但未开封)分别于 25、45 °C 放置 60 d 后,取适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下 ICP-MS 条件进样测定,记录仪器响应值并按内标法计算样品中 Al 的含量,结果见表 7。

Al 在 ICH 指导原则 Q3D 中被认定为“可能导致损伤的其他元素杂质”^[13],但未给出限量值,其限量值可遵从其他指导原则和/或地方法规和规范,如现行《美国药典》(41 版)规定了全肠外营养治疗用大容量注射液中 Al 含量限量为 25 $\mu\text{g/L}$ ^[14];《欧洲药典》(9.0 版)和 2015 年版《中国药典》(三部)均规定人血白蛋白注射液中 Al 含量限量为 200 $\mu\text{g/L}$ ^[10,15]。因此,小牛血去蛋白提取物注射液说明书参照上述文献的规定,设定 Al 含量限量为 200 $\mu\text{g/L}$ 。

由表 7 可知,3 家企业各批样品中 Al 含量在放置 60 d 后均有所升高。25 °C 条件下,A、B、C 企业样品中 Al 含量分别平均升高了 14.8%、2.5%、67.9%;45 °C 条件下,分别平均升高了 51.5%、19.1%、165.8%,放置前 Al

表6 13种元素的PDE($\mu\text{g}/\text{d}$)Tab 6 Permitted daily exposure of 13 elements($\mu\text{g}/\text{d}$)

企业	编号	Cd	Pb	As	Hg	Co	V	Ni	Tl	Ag	Mo	Cu	Cr	Ba
A	S1	-	-	1.375	-	0.011	0.237	0.433	-	-	1.676	0.125	0.182	0.078
	S2	-	-	1.226	-	0.012	0.275	0.762	-	-	1.751	0.183	0.176	0.114
	S3	-	-	1.378	-	0.014	0.202	0.156	-	-	1.617	0.110	0.346	0.129
	S4	-	-	1.244	-	0.007	0.285	0.166	-	-	1.701	0.096	0.145	0.333
	S5	-	-	1.504	-	0.015	0.238	0.801	-	-	1.798	0.266	0.191	0.356
	S6	-	-	1.203	-	0.017	0.309	0.380	-	-	1.590	0.130	0.175	0.377
	S7	-	-	1.456	-	0.016	0.251	0.200	-	-	1.625	0.103	0.161	0.281
	S8	-	-	1.374	-	0.015	0.279	0.626	-	-	1.564	0.179	0.163	0.178
	S9	-	-	1.290	-	0.008	0.313	0.216	-	-	1.630	0.113	0.185	0.375
	S10	-	-	1.403	-	0.013	0.325	0.750	-	-	1.614	0.153	0.188	0.295
	S11	-	-	1.429	-	0.017	0.341	0.626	-	-	1.513	0.129	0.149	0.315
	S12	-	-	1.708	-	0.013	0.326	0.367	-	0.160	1.752	0.112	0.158	0.242
	S13	-	-	1.540	-	0.023	0.353	0.552	-	0.444	1.723	0.081	0.319	0.275
	S14	-	-	1.701	-	0.005	0.300	0.231	-	0.253	1.702	0.153	0.284	0.187
	S15	-	-	1.622	-	0.023	0.435	0.270	-	0.380	1.700	0.043	0.200	0.182
B	S16	0.023	0.069	0.179	0.064	0.170	0.234	2.012	0.102	0.274	0.366	0.082	1.888	6.653
	S17	0.021	0.015	0.160	0.068	0.156	0.252	2.550	0.063	0.136	0.360	0.129	2.491	5.790
	S18	0.113	0.023	0.129	0.080	0.186	0.300	2.417	0.051	0.091	0.291	0.167	2.606	5.414
	S19	0.053	0.051	0.125	0.070	0.048	0.236	1.375	0.050	-	0.340	0.257	1.754	5.084
	S20	0.059	0.045	0.108	0.073	0.050	0.229	1.298	0.033	-	0.318	0.191	1.379	5.639
	S21	0.051	0.026	0.043	0.079	0.030	0.187	1.141	0.028	-	0.335	0.264	1.235	5.455
C	S22	0.515	0.263	0.305	0.175	0.095	0.220	2.388	0.226	0.391	1.074	0.100	3.788	23.941
	S23	0.840	0.405	0.567	0.186	0.093	0.275	2.451	0.360	1.901	0.960	0.129	4.056	22.113
	S24	0.504	0.228	0.251	0.194	0.099	0.237	2.497	0.288	0.702	1.032	0.087	4.063	14.999
ICH限量值 ^[9]		2	5	15	3	5	10	20	8	10	1 500	300	1 100	700

表7 不同温度条件下放置60 d后Al含量比较($n=3$)Tab 7 Comparison of aluminium content after 60 days storage at different temperatures($n=3$)

企业	编号	Al含量, $\mu\text{g}/\text{L}$			升高百分比, %	
		放置0 d	25 $^{\circ}\text{C}$	45 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	45 $^{\circ}\text{C}$
A	S1	395.210	453.701	596.080	14.8	50.8
	S2	389.060	441.583	543.370	13.5	39.7
	S3	295.405	335.875	527.340	13.7	78.5
	S4	329.335	380.382	522.915	15.5	58.8
	S5	338.805	392.675	477.025	15.9	40.8
	S6	484.255	557.862	706.780	15.2	46.0
	S7	275.800	304.207	405.978	10.3	47.2
	S8	428.425	496.973	657.632	16.0	53.5
	S9	358.670	420.361	504.290	17.2	40.6
	S10	442.250	513.895	696.544	16.2	57.5
	S11	447.610	512.513	741.242	14.5	65.6
	S12	543.945	615.202	784.913	13.1	44.3
	S13	481.925	551.322	730.116	14.4	51.5
	S14	585.005	673.926	882.773	15.2	50.9
	S15	562.875	646.060	829.678	16.2	47.4
B	S16	62.925	64.128	72.970	1.9	16.0
	S17	46.335	47.553	58.680	2.6	26.6
	S18	38.510	39.500	48.695	2.6	26.4
	S19	90.170	92.445	103.696	2.5	15.0
	S20	98.280	100.610	113.513	2.4	15.5
	S21	57.090	58.820	66.224	3.0	16.0
C	S22	771.170	1 363.940	2 005.195	76.9	160.0
	S23	833.605	1 448.435	2 060.665	73.8	147.2
	S24	707.330	1 082.645	2 052.140	53.1	190.1

含量较高的在放置后升高程度越明显。国产B企业样品在放置前Al含量最低,45 $^{\circ}\text{C}$ 放置60 d后,Al含量的最

高值为113.513 $\mu\text{g}/\text{L}$ (编号:S20),仍未超过200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的限量值;所有企业中,仅国产B企业6批样品中的Al含量符合上述限量要求。

3 讨论

3.1 样品前处理方式的选择

前期预试验发现,采用微波消解样品后,虽然可以使样品中的肽类成分得到有效破坏,但消解过程中使用的硝酸会引入一定量的待测元素,而造成空白值明显升高,加之浓酸的挥发以及溶液转移过程可能会造成样品中待测元素损失,进而使样品测定结果的准确度降低,因此微波消解法并不适用。另外,由于样品中添加的辅料为2.68%氯化钠,这超出了ICP-MS仪器测定样品时的溶液含盐量限量(不超过0.05%),因此直接测定法不适用。综合考虑,笔者分别尝试将样品经1%硝酸溶液稀释10倍、20倍、50倍和100倍后进样测定。结果显示,当样品稀释10倍或20倍时,部分元素的加样回收率接近150%,且内标元素的响应值与标准品溶液测定时比较明显降低,提示基质干扰较严重;当样品稀释100倍时,由于稀释度过大,使得样品中部分元素的测定结果低于定量限,而影响测定的准确性。因此,选择将样品稀释50倍后测定,经方法学验证均符合2015年版《中国药典》(四部)的相关要求^[10]。

3.2 测量模式的选择

前期预试验中,笔者采用标准模式和动能歧视模式

对各待测元素进行方法学验证。结果显示,采用动能歧视模式测定时,As、V、Cr等3种元素的检测限均低于标准模式一个数量级以上,其他元素采用两种模式测定时则无明显差异。考虑到碰撞气(氦气)价格较为昂贵,以及为提高检测结果的准确度,最终选择动能歧视模式测定As、V、Cr,采用标准模式测定其他11种元素。

3.3 Al含量结果分析

本研究结果显示,国产B企业的6批样品中Al含量(编号:S16~S21)符合规定(Al含量限量为200 μg/L),进口A企业和国产C企业的样品均超出限量值,特别是国产C企业的3批样品(编号:S22~S24)中Al含量均高达限量值的3~4倍。其原因可能为各企业使用的玻璃容器质量不同,在放置过程中,玻璃容器中的金属离子向药品发生了迁移。不同企业生产的样品中Al含量差异较大,部分企业的样品中Al含量超过限量值问题应引起重视,特别是静脉注射剂中过量的Al长期直接注入血液,可引起骨软化、阿尔茨海默病、低色素性贫血、慢性肾功能损伤等潜在风险^[6],因此在现行质量标准中增加对Al含量进行监控就显得十分必要。此外,3家企业样品的保质期各有不同,国产B企业为18个月,C企业为24个月,进口A企业为60个月。由于玻璃容器中Al可随贮藏时间的延长而不断浸出,因此建议重新设定该样品的有效期,以保障用药的安全性。

综上所述,该方法操作简便、准确,精密性、稳定性、重复性均较好,可用于同时测定小牛血去蛋白提取物注射液中14种元素的含量。

参考文献

[1] 任丽萍,范慧红.我国生化药品的质量现状与展望[J].中国生化药物杂志,2015,35(6):161-164.
[2] 蔡雪峰,谈弋,赵瑛,等.小牛血去蛋白提取物的临床应用进展[J].中国药师,2016,19(2):338-341.
[3] 赵宗阁,王尊文,徐康森.国内小牛血、小牛血清去蛋白提取物注射液质量分析及其抗缺氧作用研究[J].药物分析杂志,2008,28(10):1637-1640.
[4] 任丽萍,邓利娟,范慧红.火焰原子吸收法测定小牛血去

蛋白提取物浓溶液中的钠离子和钾离子[J].药物分析杂志,2014,34(4):636-638.

[5] 国家药典委员会.国家药品标准WS1-XG-029-2000[S].2003.
[6] 中国药品生物制品检定所.进口药品注册标准JX200302-48[S].2003.
[7] 左甜甜,李耀磊,金红宇,等. ICP-MS法测定18种动物药中重金属及有害元素的残留量及初步风险分析[J].药物分析杂志,2017,37(2):237-242.
[8] 孙艳,赵余庆.药食同源品中重金属的检测方法与思考[J].中草药,2011,42(11):2351.
[9] 贺婷婷.浅谈铝与人体健康的关系[J].微量元素与健康研究,2013,30(2):70-71.
[10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:4-6,244-245.
[11] 张伟,周长明,任连杰,等.微波消解-ICP-MS测定人血白蛋白中痕量元素[J].药物分析杂志,2015,35(3):553-557.
[12] 钟振华,涂明珠,万星,等.微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定倍丙酯氯化钠注射液中8种金属元素的含量[J].中国药房,2018,29(12):1612-1616.
[13] ICH. ICH Q3D Step 4 Version Guideline for Elemental Impurities[EB/OL]. (2014-12-16)[2019-04-09]. <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
[14] The United States Pharmacopoeia Commission. The United States Pharmacopoeia 41[S]. Baltimore: United Book Press,2018:5947-5948.
[15] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 9.0[S]. Strasbourg: European Drug Quality Administration,2017:2660-2662.
[16] 王敏力,肖林,梁蔚阳,等.人血白蛋白批签发留样铝离子含量检验结果讨论与监管思考[J].中国药学杂志,2018,53(2):145-153.

(收稿日期:2019-03-08 修回日期:2019-05-24)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅